

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Název práce

*Allogenní žilní štěp v rekonstrukční cévní chirurgii - použití imunosuprese v experimentu.*

Title

*Allogenuous venous graft in reconstructive vascular surgery - the use of immunosuppression in experiment.*

Autor

**MUDr. Martin Varga**

05.05.2012

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta

Školitel: MUDr. Martin Oliverius, PhD.

Konzultant: MUDr. Ivan Matia, PhD.

**OBSAH**

<b>OBSAH</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRAKT (CZECH)</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	<b>5</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>6</b>
<b>2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b>	<b>8</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY</b>	<b>9</b>
<b>4 EXPERIMENT 1</b>	<b>10</b>
4.1 Materiál a metody	10
4.2 Výsledky	10
4.3 Diskuze	10
<b>5 EXPERIMENT 2</b>	<b>11</b>
5.1 Materiál a metody	11
5.2 Výsledky	11
5.3 Diskuze	11
<b>6 EXPERIMENT 3</b>	<b>12</b>
6.1 Materiál a metody	12
6.2 Výsledky	12
6.3 Diskuze	12
<b>7 EXPERIMENT 4</b>	<b>13</b>
7.1 Materiál a metody	13
7.2 Výsledky	14
7.3 Diskuze	14
<b>8 ZÁVĚRY DIZERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>15</b>
<b>9 LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>10 SEZNAM PUBLIKACÍ</b>	<b>19</b>
10.1 Publikace, které jsou podkladem disertace	19
10.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace	19

**ABSTRAKT (CZECH)**

**Úvod:** Výzkum použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii je v současnosti zaměřen na 3 velké oblasti: 1) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních i periferních žilních bypasů, 2) ovlivnění rejekce cévních allograftů, 3) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních tepen po jejich perkutánní plastice. Jedním z moderních imunosupresivních přípravků vhodným k použití v těchto indikacích je takrolimus - FK506. Při použití v experimentu inhiboval FK506 reakci tepenných alloštěpů i rozvoj intimální hyperplazie po perkutánní plastice koronárních tepen.

**Cíl práce:** Ověřit účinky imunosuprese pomocí FK506 na průběh arterializace syngenních a allogenních žilních štěpů u potkanů.

**Materiál a metody:** Samce potkanů kmene Lewis (LEW) (n = 46) jsme použili jako příjemce žilních štěpů. Dárce allogenních štěpů byli potkani kmene Brown-Norway (BN) (n = 13) a syngenních štěpů potkani kmen Lewis (LEW) (n = 10). Příjemce jsme rozdělili do šesti skupin. Ve skupině A, E a F byla zvířata po syngenní (LEW do LEW) a ve skupině B, C a D po allogenní (BN do LEW) transplantaci. Zvířata ve skupině C a F dostávala denně 0.02 mg a zvířata ve skupině D a F 0.01 mg FK506 na 100 g váhy. Skupina A a B byla bez imunosuprese. Třicátý pooperační den jsme srovnávali histologické nálezy mezi skupinami.

**Výsledky:** Rozdíl koncentrace FK506 30. pooperační den mezi zvířaty s vyšší a nižší dávkou byl signifikantní ( $p < 0.001$ ) v allogenním (skupina C a D) i syngenním (skupina E a F) experimentu. Po syngenní transplantaci jsme pozorovali proces arterializace žilní stěny (adaptace na tlakové podmínky v tepenném řečišti) u všech zvířat (skupina A, E a F). Použití FK506 mělo v tomto procesu inhibiční vliv na rozvoj intimální hyperplazie. Tato inhibice byla závislá na dávce imunosuprese (šířka tunica intima ve skupině A  $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ , ve skupině E  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$  a ve skupině F  $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ). U allogenních zvířat bez imunosuprese (skupina B) jsme 30. den po transplantaci pozorovali rejekci žilní stěny s destrukcí a desorganizací intimální vrstvy bez rozvoje intimální proliferace. Použití FK506 v obou dávkách mělo inhibiční vliv na rozvoj rejekce allogenní žilní stěny a umožnilo proces její arterializace. Mezi skupinami C a D jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly v tloušťce intimální vrstvy ani v stupni infiltrace žilní stěny CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami.

**Závěr:** U autologních žilních štěpů vedlo podávání FK506 k inhibici rozvoje intimální hyperplazie. Tento inhibiční účinek FK506 byl závislý na dávce.

U allogenních žilních štěpů potlačilo podávání FK506 jejich rejekci. Tato inhibice umožnila proces žilní přestavby a arterializaci žilní stěny. K supresi rejekce byla dostačující i poloviční dávka FK506 nutná k inhibici rejekce tepenných alloštěpů na stejném zvířecím modelu.

**Klíčová slova:** žilní allograft - imunosuprese - transplantace - FK506 - intimální hyperplazie

**ABSTRACT (ENGLISH)**

**Background:** The investigation of the immunosuppression usage in cardiovascular surgery and interventional cardiology is, at present, concentrated on three main topics: 1) influence on intimal hyperplasia of coronary and peripheral vascular reconstructions 2) influence on rejection of allogeneic vascular grafts and 3) influence on intimal hyperplasia of coronary arteries after endovascular interventions. Modern immunosuppressive drug FK506 (Tacrolimus) could have a positive effect for these indications. In experimental study, FK506 inhibited rejection of arterial allografts and also inhibited intimal hyperplasia in percutaneous coronary interventions.

**Aims:** The purpose of this study was to evaluate the effect of systemic tacrolimus treatment on the process of arterialisation of allogeneic and syngeneic venous grafts in a rat vein-to-artery implantation model.

**Material and Methods:** Lewis (LEW) rats were used as recipients of syngeneic (Lewis) or allogeneic (Brown-Norway; BN) ilio-lumbar veins which were implanted into abdominal aorta. Recipients were divided into six groups. In groups A, E and F were animals after syngeneic (LEW to LEW) and in groups B, C and D were animals after allogeneic (BN to LEW) transplantations. Animals in the groups C and F had daily intramuscular injections of tacrolimus of 0.2 mg/kg and animals in groups D and F 0.1 mg/kg, respectively. The groups A and B had no treatment. Light microscope evaluations of arterialised vein grafts were performed 30 days after operation.

**Results:** The blood level of FK506 30 days after transplantation was statistically different between the allogeneic groups C and D and between syngeneic groups E and F ( $p < 0.001$ ). In syngeneic groups (A, E, F) we observed venous graft arterialisation in all animals. The use of FK506 led to inhibition of intimal hyperplasia in these animals. Moreover, this inhibition was dose dependent (thickness of intimal layer: group A  $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ , group E  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$  and group F  $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ). The process of venous graft arterialisation was also present in the allogeneic group D with a minimal dose as well as in group C with low dose of FK506. But we observed no difference in thickness of the intimal layer between these groups (group C  $15.0 \pm 8.4 \mu\text{m}$ , group D  $15.1 \pm 6.1 \mu\text{m}$ ). In contrast, the allogeneic group B without immunosuppression showed no histological signs of arterialisation with destruction of intimal layer without signs of proliferation.

**Conclusion:** Treatment with FK506 showed a dose dependent inhibition of neointimal hyperplasia in arterialised syngeneic vein grafts in rats.

In allogeneic vein grafts, FK506 was sufficient even at a minimal dose (half-dose compared to that use in arterial transplantation model) to inhibit acute rejection and facilitated their arterialisation 30 days after transplantation.

**Key words:** venous allograft - immunosuppression - transplantation- FK506 - intimal hyperplasia

## 1 ÚVOD

### Použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii

Výzkum použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii je v současnosti zaměřen na 3 velké oblasti: 1) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních i periferních žilních bypasů, 2) ovlivnění rejekce cévních allograftů, 3) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních tepen po jejich perkutánní plastice<sup>1-3</sup>. Z dostupných imunosupresivních přípravků se v těchto oblastech nejčastěji používají: cyklosporin A (CyA), sirolimus a nově i takrolimus (FK506)<sup>3-9</sup>.

### Intimální hyperplazie žilních autoštěpů

Pro pacienty trpící těžšími stupni ischemické choroby dolních končetin a vyžadující cévní rekonstrukci je materiálem volby vlastní véna saphena magna<sup>10,11</sup>. Implantace žilního štěpu do tepenného řečiště vede ke změnám v žilní stěně a k její adaptaci na nové biomechanické podmínky - arterializaci žilního štěpu<sup>12</sup>. Arterializace je spojena s charakteristickými změnami v proliferaci, migraci a apoptóze buněk cévní stěny a v produkci extracelulární matrix<sup>13</sup>. Tato adaptace vede k typickým anatomickým změnám žilní stěny: intimální hyperplázii, ztlustění mediální vrstvy s dobře organizovanými vrstvami hladkých svalových buněk a neovaskularizaci adventiciální vrstvy<sup>12,14,15</sup>.

U autologních žilních štěpů je ale nadměrná intimální hyperplazie s následnou progresí aterogeneze častou příčinou jejich pozdních uzávěrů<sup>16</sup>. Rozsah intimální hyperplazie je úměrný poškození endotelové vrstvy způsobené zejména chirurgickou manipulací, ischemií a také chronickou fyzickou traumatizací žilní stěny v tepenném řečišti<sup>14,17-21</sup>.

Tyto nové poznatky vedly k vývoji nových terapeutických metod zaměřených na její potlačení. V klinické praxi se to projevilo zejména zavedením stentů potažených léky (sirolimus, paklitaxel) používaných v léčbě koronárních stenóz<sup>22,23</sup>. U léky uvolňujících stentů se prokázal nižší počet restenóz i závažných srdečních příhod<sup>24,25,26</sup>.

### Rejekce žilních alloštěpů

Mnoho pacientů s těžkými stupni ischemické choroby dolních končetin a nemožností použití cévní protézy pro vysoké riziko infekce nebo omezený výtok v periférii je kontraindikovaných k cévní rekonstrukci z důvodu nepřítomnosti vhodné vlastní véna saphena magna<sup>27</sup>. U většiny těchto pacientů je následně provedena vysoká amputace postižené končetiny.

V poslední době se objevuje množství literárních údajů hodnotících výsledky cévních rekonstrukcí pomocí allogenních žilních i tepenných štěpů<sup>27</sup>. Jejich nevýhodou je ale rejekce, která vede v konečném důsledku k uzávěru rekonstrukce.

Z posledních poznatků vyplývá, že žilní stěna allogenních štěpů vyvolává v těle příjemce buněčnou i humorální imunitní reakci<sup>28-30</sup>. Výsledkem je ztráta normální

struktury žilní stěny, která se klinicky projeví jako trombóza a uzávěr nebo jako dilatace a ruptura štěpu<sup>31</sup>. Mezi hlavní komponenty cévní stěny vyvolávající imunitní odpověď příjemce patří vzhledem ke svému obsahu MHC antigenů endotelová vrsta v lumen cévy, endotel ve vasa vasorum a svalové buňky<sup>31</sup>. Studie na potkanech, psech a prasatech jasně prokázaly, že žilní allografty jsou antigenní stejně jako jiné allogenní tkáně<sup>32-34</sup>.

Výsledky cévních allovenózních rekonstrukcí se pohybují v širokém spektru jednorocní průchodnosti (10-70 %) <sup>6</sup>. Dlouhodobou průchodnost rekonstrukce ovlivňuje ve značné míře rejekce štěpu. Použití imunosuprese u příjemců ale není ve světě běžné. Také není stanoven definovaný imunosupresivní protokol.

### **Použití imunosuprese v kardiologii a kardiovaskulární chirurgii**

Cyklosporin A (CyA) je nejčastějším imunosupresivem používaným po cévních transplantacích v klinické praxi <sup>6</sup>. Nevýhodou CyA po transplantaci cévních alloštěpů je kromě jiného i indukce produkce TGF-beta (transforming growth factor) a tím zvýšení fibrinogeneze<sup>35</sup>. FK506 inhibuje časnou fázi aktivace T lymfocytů závislou na interleukinu-2 a také inhibuje produkci TGF-beta<sup>36</sup>. V klinice se používá v kombinaci s jinými imunosupresivy při potlačení imunitní reakce, zejména po transplantaci ledvin a jater<sup>37</sup>.

FK506 (generický název: tacrolimus) patří mezi moderní imunosupresivní přípravky. I když má odlišnou chemickou strukturu než cyklosporin A, patří spolu s ním do skupiny kalcineurínových inhibitorů<sup>38</sup>. V dostupné literatuře mimo výsledků publikovaných naším pracovištěm jsme se nesetkali s použitím FK506 po cévních transplantacích<sup>39</sup>.

FK506 je ve srovnání se sirolimem méně účinný při potlačování proliferace a migrace hladkých svalových buněk cévní stěny a má také nižší antiproliferativní účinek na endoteliální buňky<sup>40,41</sup>. V prasečím modelu byla míra reendotelizace koronárních tepen podobná mezi stenty uvolňujícími takrolimus a prostými kovovými stenty<sup>3,42</sup>. Je pravděpodobné, že právě tyto vlastnosti FK506 povedou k jeho využití v další generaci lékem potažených stentů<sup>3</sup>.

V experimentu byl FK506 úspěšně použit také po transplantaci aortálních štěpů<sup>7</sup>. V naší vlastní experimentální práci jsme dokonce prokázali imunosupresivní účinky FK506 po transplantaci břišní aorty u potkanů i při jeho oddálené aplikaci<sup>43</sup>. Hladina FK506 se v našem experimentu pohybovala kolem 5 ng/ml při denní dávce 0.02 mg na 100 g hmotnosti zvířete.

Podávání imunosuprese je u každého pacienta limitováno jejími nežádoucími účinky. Proto je nutné používat co nejnižší, ale ještě efektivní dávku. K ověření této dávky u jednotlivých imunosupresiv slouží i zvířecí modely. V naší práci jsme se proto zaměřili na studium vlivu takrolimu (FK506) na intimální hyperplazii žilních autograftů a rejekci žilních allograftů na potkaním modelu.

## **2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE**

### **Hypotéza 1**

Předpokládáme, že model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů bude technicky zvládnutelný a umožní sledování změn ve stěně žilních štěpů v syngenních i allogenních podmínkách.

### **Hypotéza 2**

Předpokládáme, že imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rozvoje intimální hyperplazie arterializovaných autologních žilních štěpů u potkana.

### **Hypotéza 3**

Předpokládáme, že imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rejekce transplantovaných žilních alloštěpů u potkana a umožní jejich adaptaci na podmínky tepenného řečiště.

### **Hypotéza 4**

Předpokládáme, že antigenicita žilních alloštěpů je ve srovnání s tepennými alloštěpy nižší a k potlačení jejich rejekce bude dostatečná i poloviční dávka imunosuprese účinné po transplantaci aorty.

### **Cíl práce 1**

Vytvořit a otestovat model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů.

### **Cíl práce 2**

Po interpozici autologních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od implantace její vliv na intimální hyperplazii těchto autologních štěpů.

### **Cíl práce 3**

Po interpozici allogenních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od transplantace její vliv na rejekční změny a průběh arterializace těchto alloštěpů.

### **Cíl práce 4**

Po interpozici allogeních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 v poloviční dávce použité po allotransplantaci tepen a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od allotransplantace její vliv na rejekční změny a průběh arterializace těchto alloštěpů.



### **3 MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 Zvířata**

V experimentu jsme použili celkem 91 samců potkanů různých kmenů (Wistar n = 22, Lewis n = 56, Brown-Norway n = 13). K zavedení modelu a chirurgické techniky interpozice iliolumbálních žil do abdominální aorty u potkana jsme použili jako dárce i příjemce žilních štěpů 22 potkanů kmene Wistar.

K cílům práce 2, 3 a 4 jsme jako příjemce syngenních nebo allogenních žilních štěpů použili potkany kmene Lewis. Jako dárce syngenních žilních štěpů jsme použili potkany kmene Lewis a jako dárce allogenních žilních štěpů jsme použili samce potkany kmene Brown-Norway.

#### **3.2 Operační postup**

Dárcům žilních štěpů jsme v celkové anestézii odebrali dva 1-1.5 cm dlouhé segmenty iliolumbálních žil. Štěpy byly uloženy ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě do doby transplantace. Příjemcům jsme v celkové anestézii transplantovali žilní štěpy ortotopicky do subrenálního úseku břišní aorty.

#### **3.3 Skupiny zvířat**

Celkově jsme v rámci experimentu vytvořili 7 skupin zvířat označených velkými písmeny (A, B, C, D, E, F a T). Podrobné charakteristiky skupiny A až F uvádíme v tabulce 1.

Skupina T byla složená z potkanů kmene Wistar a sloužila pouze k nácviku operační techniky a v tabulkách ji dále neuvádíme.

Skupina A byla složená z potkanů po syngenní (LEW do LEW) a skupina B po allogenní (BN do LEW) transplantaci bez podávání imunosuprese.

Zvířata ve skupině C a skupině D byla po allogenní transplantaci (BN do LEW) s podáváním imunosuprese.

Zvířata ve skupině E a F byla po syngenní (LEW do LEW) transplantaci.

#### **3.4 Protokol imunosuprese**

FK506 jsme aplikovali intramuskulárně v jedné denní dávce 0.02 mg na 100 g hmotnosti zvířete ve skupině C a F a 0.01 mg na 100 g hmotnosti zvířete ve skupině D a E.

**Tabulka 1. Základní údaje experimentálních skupin a operačního zákroku.**

LEW – potkan Lewis

BN – potkan Brown-Norway

\*,\*\* Rozdíl mezi oběma skupinami s imunosupresí byl statisticky signifikantní ( $p = 0,001$ )

Skupina	Charakteristika	Imunosuprese	Počet zvířat	Úmrtí	Doba studené ischemie (min)	Operační čas (min)	Aortální svorka (min)	Váha den 0 (g)	Váha den 30 (g)	Hladina FK506 30 den (ng/mL)
A	LEW- LEW	Ne	8	2	215±138	130±19	79±8	223±21	295±17	Ne
B	BN - LEW	Ne	10	1	199±85	115±13	66±10	317±18	366±25	Ne
C	BN - LEW	FK506 0,02mg/100g	8	1	190±85	100±14	75±9	275±20	305±18	5.57±0.96*
D	BN - LEW	FK506 0,01mg/100g	8	2	192±76	96±6	66±6	314±15	334±48	3.20±0.66*
E	LEW- LEW	FK506 0,01mg/100g	6	0	190±85	90±7	60±6	320±40	360±24	3.50±0.59**
F	LEW- LEW	FK506 0,02mg/100g	6	1	180±80	95±12	62±7	330±30	360±18	6.10±0.90**

## 4 EXPERIMENT 1

### 4.1 Materiál a metody

Skupina zvířat T byla složena z potkanů kmene Wistar a sloužila pouze k nácviku operační techniky a vypracování a zavedení modelu interpozice iliolumbálních žil u potkana.

### 4.2 Výsledky

K nácviku jsme použili 22 potkanů kmene Wistar. V průběhu experimentu uhynulo 12 potkanů (55 %) nejčastěji v důsledku krvácení z anastomózy. U 10 potkanů jsme provedli úspěšnou interpozici iliolumbální žíly do abdominální aorty s dlouhodobým přežitím zvířete a průchodnou anastomózou.

### 4.3 Diskuze

V literatuře je popsáno několik experimentálních modelů žilní arterializace na malých zvířatech<sup>1</sup>. Experimenty na potkanech jsou ve srovnání s většími zvířaty výhodné pro malou náročnost na ošetrovatelskou péči a také pro nižší finanční náklady. Operace jsou ale technicky náročné vzhledem k malým rozměrům anatomických struktur. Použití operačního mikroskopu a nácvik mikrochirurgických technik je tudíž nutností.

Vzhledem k našim předešlým zkušenostem s implantací břišní aorty do břišní aorty potkana jsme se rozhodli v rámci experimentu s arterializací venózních štěpů v naší laboratoři zavést a otestovat model transplantace iliolumbální žíly do aorty potkana<sup>43</sup>. Tento model umožňuje jednak použití 2 iliolumbálních žil z jednoho dárcovského zvířete a jednak je anastomóza na břišní aortě ve srovnání s femorální nebo karotickou artérií technicky lépe proveditelná.

## **5 EXPERIMENT 2**

### **5.1 Materiál a metody**

K ověření hypotézy 2 jsme porovnali nálezy syngenní skupiny A bez imunosuprese se syngenní skupinou E s nižší a syngenní skupinou F s vyšší dávkou FK506. Podrobné charakteristiky skupin uvádí tabulka 1.

### **5.2 Výsledky**

Koncentrace FK506 měřená 30. pooperační den byla ve skupině E  $3.50 \pm 0.59$  ng/ml a ve skupině F  $6.10 \pm 0.90$  ng/ml ( $p = 0.001$ ).

Lumen žilních štěpů bylo ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. V tunica intima došlo ve všech skupinách k hyperplazii subendoteliální neointimální vrstvy. Ve skupinách E a F léčených FK506 jsme zaznamenali inhibici intimální hyperplazie ve srovnání se skupinou A ( $p < 0.01$ ). Šíře intimální vrstvy štěpů s vyšší dávkou FK506 byla ve srovnání s žilními štěpy s nižší dávkou FK506 statisticky nižší ( $p < 0.05$ ) ( $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$  versus  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ).

Histologický obraz v tunica media i adventitia byl shodný ve všech skupinách.

### **5.3 Diskuze**

U syngenních štěpů došlo ve všech skupinách 30. pooperační den k arterializaci žilní stěny s proliferací intimální vrstvy a hladkých svalových buněk v mediální vrstvě. Podávání FK506 ale vedlo k signifikantnímu potlačení rozsahu intimální hyperplazie ve srovnání se štěpy bez imunosuprese. Tento inhibiční účinek FK506 byl závislý na jeho denní dávce.

Ve shodě s naší prací byla inhibice intimální hyperplazie po použití FK506 pozorována i na koronárním prasečím modelu. Hamada a spol. prokázali 4 týdny po implantaci stentů uvolňujících FK506 do koronární tepny výrazně nižší neointimální formaci ve srovnání s prostými metalickými stenty<sup>3</sup>.

Předchozí experimenty na buněčných kulturách prokázaly také antiproliferativní účinek FK506 na hladké svalové buňky cévní stěny<sup>3,42</sup>. V našem experimentu jsme ve skupině s vyšší dávkou FK506 pozorovali tendenci ke ztenčení mediální vrstvy ve srovnání se skupinou bez imunosuprese. Toto ztenčení mediální vrstvy ale nebylo statisticky signifikantní.

Naše studie potvrdila inhibiční účinek FK506 na tvorbu intimální hyperplazie u autologních žilních štěpů po jejich implantaci do tepenného řečiště. V případě vytvoření vektoru k lokální aplikaci může FK506 představovat účinný lék v terapii intimální hyperplazie v kardiovaskulární chirurgii.

## **6 EXPERIMENT 3**

### **6.1 Materiál a metody**

K ověření hypotézy 3 jsme srovnávali nálezy syngenní skupiny A bez imunosuprese s allogenní skupinou B bez imunosuprese a allogenní skupinou C s imunosupresí pomocí FK506 v denní dávce 0.02 mg/100 g hmotnosti zvířete.

### **6.2 Výsledky**

Ve skupině C byla průměrná hodnota koncentrace FK506  $5.57 \pm 0.96$  ng/ml.

Lumen žilních štěpů bylo ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. U allogenní imunosuprimované skupiny C došlo stejně jako ve skupině A k hyperplazii subendoteliální neointimální vrstvy. U allogenních zvířat bez imunosuprese (skupina B) došlo k destrukci a desorganizaci intimální vrstvy. Šíře intimální vrstvy byla v této skupině statisticky nižší ve srovnání s oběma předešlými skupinami ( $p < 0.01$ ).

V tunica media allogenní skupiny s imunosupresí (skupina C) stejně jako u syngenní skupiny A byl 30. pooperační den přítomen obraz adaptace žilní stěny na tlakové podmínky v tepenném řečišti s novotvorbou vícečetné svalové vrstvy. Zcela minimálně byly přítomny CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivní buňky.

Na druhé straně u allogenní skupiny bez imunosuprese (skupina B) nedošlo k vytvoření svalových vrstev a medie byla infiltrována všemi typy sledovaných imunokompetentních buněk.

Stupeň infiltrace tunica adventitia buňkami CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami byl bez signifikantního rozdílu mezi skupinou A a C. Infiltrace buňkami CD4+ byla u imunosuprimované skupiny C dokonce nižší než u skupiny A.

V adventiciální vrstvě allogenních štěpů bez imunosuprese (skupina B) jsme pozorovali statisticky vyšší ( $p < 0.001$ ) infiltraci CD4+, CD8+ i Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami.

### **6.3 Diskuze**

Výsledky této části naší práce prokázaly arterializaci žilních alloštěpů 30. pooperační den po žilní transplantaci jen v podmínkách imunosuprese. V podmínkách bez imunosuprese vedla rejekce k destrukci intimální vrstvy a desorganizaci struktury celé žilní stěny.

U allogenních žil malého kalibru vede destrukce jejich stěny k trombóze a uzavěru<sup>44</sup>. Na psím modelu při interpozici dolní duté žíly do abdominální aorty vedl proces rejekce k aneurysmatické dilataci transplantované žíly v období 30 denního sledování<sup>45</sup>. V našem modelu na potkanech jsme žádnou tvorbu výdutí žilních štěpů ve skupině bez imunoprese 30 dnů po operaci nepozorovali. Nicméně se domníváme, že by k tomu došlo při prodloužení doby sledování.

Od 70. let minulého století byly zkoumány různé imunopresivní protokoly, které by vedly k inhibici imunitní reakce příjemce a prodloužení průchodnosti žilních alloštěpů<sup>8,46,47</sup>. Methylprednisolon a azathioprin, a to ani v kombinaci s prednisonem (v dávce 5 mg/kg/den a 2.5 mg/kg/den), nebyly schopny inhibovat imunitní reakci příjemce a prodloužit průchodnost alloštěpů na psím modelu<sup>44,48-50</sup>. Cyklosporin A byl poprvé použit na psím modelu allogenní transplantace jugulární žíly do oblasti arteria carotis Bandlienem a spol. v roce 1983<sup>51</sup>. V monoterapii nebyl ani cyklosporin A, ani mykofenolát mofetil schopen zlepšit průchodnost žilních alloštěpů.

Cyklosporin A může způsobit poškození buněk endoteliální vrstvy a stimulovat fibrózu cévní stěny cestou zvýšené produkce transformujícího růstového faktoru beta (transforming growth factor-beta)<sup>35,52</sup>.

FK506 (takrolimus) je ve srovnání s cyklosporinem A účinnější imunopresivum a v klinické praxi se běžně používá po orgánových transplantacích<sup>37</sup>. V našem experimentu potlačil FK506 v dávce prokázaně účinné u tepenných alloštěpů infiltraci allogenní žilní stěny CD8+ a CD4+ buňkami. Tento efekt vedl k inhibici destrukce žilní stěny zprostředkované T lymfocyty a umožnil její arterializaci stejně jako v případě syngenních žilních štěpů. Dále jsme u allogenních žil s imunopresí pozorovali proliferaci hladkých svalových buněk v mediální vrstvě. Zdá se, že suprese příjemcovské imunitní reakce v časném potransplantačním období vede k zachování allovenózních hladkých svalových buněk dárce. Přítomnost a následná proliferace těchto buněk vedla k zesílení a arterializaci žilní stěny u všech imunoprimovaných žilních alloštěpů. Při absenci imunoprese nebyly allogenní žilní štěpy schopny vyvinout typické známky arterializace. Allogenní hladké svalové buňky dárce byly zničeny masivní infiltrací imunokompetentních buněk příjemce a tím nemohlo dojít k jejich proliferaci a adaptaci na nové biomechanické podmínky tepenného systému.

## **7 EXPERIMENT 4**

### **7.1 Materiál a metody**

K ověření hypotézy 4 jsme srovnávali nálezy mezi syngenní skupinou A bez imunoprese a allogenní imunoprimovanou skupinou C a allogenní imunoprimovanou skupinou D s poloviční dávkou imunoprese.

### **7.2 Výsledky**

Rozdíl průměrné koncentrace FK506 mezi skupinou C ( $5.57 \pm 0.96$  ng/ml) a skupinou D ( $3.20 \pm 0.65$  ng/ml) byl statisticky významný ( $p = 0.001$ ).

Lumen žilních štěpů bylo 30. pooperační den ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. U allogenní imunosuprimované skupiny C a D došlo k hyperplazii subendoteliální neointimální vrstvy. Histologický obraz byl stejný jako u syngenní skupiny A. Mezi skupinami jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly v tloušťce intimální vrstvy.

V tunica media byl ve všech skupinách přítomen obraz adaptace žilní stěny s novotvorbou vícečetné svalové vrstvy 30. pooperační den. Dále byly zcela ojediněle přítomné CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivní buňky.

V tunica adventitia byl stupeň infiltrace CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami bez signifikantního rozdílu mezi skupinami. Infiltrace CD4+ buňkami byla u skupiny C a D dokonce nižší než u skupiny A.

### 7.3 Diskuze

V tomto experimentu jsme prokázali, že rejekce žilních alloštěpů byla potlačena i poloviční dávkou FK506 se sérovou koncentrací 3.2 ng/ml. Tato dávka byla ještě dostatečná k potlačení infiltrace žilní stěny CD8+ a CD4+ buňkami a inhibici T-buňkami zprostředkované destrukce žilní stěny. To vedlo k zachování allogenózních hladkých svalových buněk dárce. Přítomnost a následná proliferace těchto buněk vedla k zesílení a arterializaci žilních alloštěpů. V podmínkách bez imunoprese vedla rejekce k destrukci intimální vrstvy a desorganizaci struktury celé žilní stěny.

V dostupné literatuře jsme se mimo výsledků publikovaných našim pracovištěm neseťkali s klinickým ani experimentálním použitím FK506 po žilní transplantaci<sup>39,53</sup>. Optimální dávka FK506 po tepenné transplantaci u potkanů byla zkoumána Azumou a spol.<sup>7</sup>. Závěrem jejich práce bylo, že denní dávka 0.02 mg na 100 g zvířete je bezpečná a zároveň ještě dostatečná k potlačení akutní rejekce tepen s tvorbou intimální hyperplazie. Tato dávka byla dostatečná i k prevenci chronické rejekce.

## **8 ZÁVĚRY DIZERTAČNÍ PRACE**

### **Závěr 1**

Naše studie prokázala, že model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů je technicky zvládnutelný a vhodný ke sledování změn souvisejících s arterializací žilních auto- i alloštěpů.

### **Závěr 2**

Naše studie prokázala, že imunosuprese pomocí FK506 vedla k potlačení rozvoje intimální hyperplazie arterializovaných žilních autologních štěpů u potkana.

### **Závěr 3**

Naše studie prokázala, že imunosuprese pomocí FK506 v denní dávce 0.02 mg/100 g váhy zvířete vedla k potlačení rejekce transplantovaných žilních alloštěpů u potkana a umožnila jejich adaptaci na podmínky tepenného řečiště.

### **Závěr 4**

Naše studie prokázala, že k potlačení rejekce žilních alloštěpů potkanů je dostatečná i poloviční denní dávka (0.01 mg/100 g váhy zvířete) imunosuprese účinné po transplantaci tepen a i tato dávka umožnila průběh arterializace žilních alloštěpů.

**9 LITERATURA**

1. Schachner T, Laufer G, Bonatti J: In vivo (animal) models of vein graft disease. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 30:451
2. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R: Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 110:1732
3. Hamada N, Miyata M, Eto H, et al.: Tacrolimus-eluting stent inhibits neointimal hyperplasia via calcineurin/NFAT signaling in porcine coronary artery model. *Atherosclerosis.* 2012 208:97
4. Brockbank KG, McNally RT, Walsh KA: Cryopreserved vein transplantation. *J Card Surg.* 1992 7:170
5. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al.: Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 2004 77:1580
6. Randon C, Jacobs B, De Ryck F, Beele H, Vermassen F: Fifteen years of infrapopliteal arterial reconstructions with cryopreserved venous allografts for limb salvage. *J Vasc Surg.* 2010 51:869
7. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y: Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg.* 1999 29:694
8. Posner MP, Makhoul RG, Altman M, et al.: Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression. *J Am Coll Surg.* 1996 183:208
9. Carpenter JP, Tomaszewski JE: Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Vasc Surg.* 1997 26:32
10. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Section D: chronic critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000 19 Suppl A:S144
11. Carpenter JP, Tomaszewski JE: Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response. *J Vasc Surg.* 1998 27:492
12. Kwei S, Stavrakis G, Takahas M, et al.: Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol.* 2004 164:81
13. Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994 330:1431
14. Westerband A, Crouse D, Richter LC, et al.: Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg.* 2001 33:561
15. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q: Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1998 153:1301
16. Wallitt EJ, Jevon M, Hornick PI: Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thorac Surg.* 2007 84:317
17. Raja SG, Haider Z, Ahmad M, Zaman H: Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ.* 2004 13:403
18. Chlupac J, Filova E, Bacakova L: Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol Res.* 2009 58:S119



19. Angelini GD, Passani SL, Breckenridge IM, Newby AC: Nature and pressure dependence of damage induced by distension of human saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res.* 1987 21:902
20. Leask RL, Butany J, Johnston KW, Ethier CR, Ojha M: Human saphenous vein coronary artery bypass graft morphology, geometry and hemodynamics. *Ann Biomed Eng.* 2005 33:301
21. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK: Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol.* 2006 84:115
22. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al.: A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002 346:1773
23. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al.: A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004 350:221
24. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al.: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003 349:1315
25. Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ: A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet.* 2004 364:583
26. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al.: Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med.* 2007 356:998
27. Farber A, Major K, Wagner WH, et al.: Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc Surg.* 2003 38:15
28. Madden R, Lipkowitz G, Benedetto B, Kurbanov A, Miller M, Bow L: Decellularized cadaver vein allografts used for hemodialysis access do not cause allosensitization or preclude kidney transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2002 40:1240
29. Lopez-Cepero M, Sanders CE, Buggs J, Bowers V: Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts. *Transplantation.* 2002 73:817
30. Balzer KM, Luther B, Sandmann W, Wassmuth R: Donor-specific sensitization by cadaveric venous allografts used for arterial reconstruction in peripheral arterial occlusive vascular disease. *Tissue Antigens.* 2004 64:13
31. Couvelard A, Leseche G, Scoazec JY, Groussard O: Human allograft vein failure: immunohistochemical arguments supporting the involvement of an immune-mediated mechanism. *Hum Pathol.* 1995 26:1313
32. Axthelm SC, Porter JM, Strickland S, Baur GM: Antigenicity of venous allografts. *Ann Surg.* 1979 189:290
33. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R: Posttransplant antibodies and fresh venous allograft failure in dogs. *Transplantation.* 1994 58:537
34. Stevens SL, Tyler JD, Freeman MB, et al.: Factors affecting patency of venous allografts in miniature swine. *J Vasc Surg.* 1990 12:361
35. Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M: In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation.* 1997 63:1037

36. Faivre L, Saoudi S, Astier A, et al.: FK 506 dose in transplantation: from theory to practice. *Transplant Proc.* 2001 33:2594
37. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J: A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation.* 2002 73:775
38. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A: Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit.* 1995 17:584
39. Matia I, Janousek L, Marada T, Adamec M: Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007 34:424
40. Hafizi S, Mordi VN, Andersson KM, Chester AH, Yacoub MH: Differential effects of rapamycin, cyclosporine A, and FK506 on human coronary artery smooth muscle cell proliferation and signalling. *Vascul Pharmacol.* 2004 41:167
41. Steffel J, Latini RA, Akhmedov A, et al.: Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation.* 2005 112:2002
42. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, et al.: Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 48:286
43. Matia I, Lodererova A, Adamec M: Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl Int.* 2007 20:371
44. Carpenter EW, Lindenauer SM: Immunosuppression in arterial and venous allografts. *Arch Surg.* 1973 106:77
45. Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, et al.: Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment. *J Surg Res.* 1996 62:95
46. Miller VM, Bergman RT, Gloviczki P, Brockbank KG: Cryopreserved venous allografts: effects of immunosuppression and antiplatelet therapy on patency and function. *J Vasc Surg.* 1993 18:216
47. Perloff LJ, Reckard CR, Rowlands DT, Jr., Barker CF: The venous homograft: an immunological question. *Surgery.* 1972 72:961
48. Vermassen F, Degrieck N, De Kock L, et al.: Immunosuppressive treatment of venous allografts. *Eur J Vasc Surg.* 1991 5:669
49. Ricotta JJ, Collins GJ, Jr., Rich NM, Reynolds DG: Failure of immunosuppression to prolong venous allograft survival. *Arch Surg.* 1980 115:99
50. Augelli NV, Lupinetti FM, el Khatib H, Sanofsky SJ, Rossi NP: Allograft vein patency in a canine model. Additive effects of cryopreservation and cyclosporine. *Transplantation.* 1991 52:466
51. Bandlien KO, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Choudhury SP, Cortez JA: Immunosuppression with cyclosporine. A new approach to improve patency of venous allografts. *Arch Surg.* 1983 118:829
52. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni A, Remuzzi G: Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest.* 1986 55:455
53. Matia I, Adamec M, Janousek L, et al.: [Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes]. *Rozhl Chir.* 2008 89:45

## 10 SEZNAM PUBLIKACÍ

### 10.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

#### a) S impact factorem

[1] **Varga**, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. The minimal dose of FK506 is sufficient to facilitate the arterialisation of venous allografts in rats. *European Surgery Acta Chirurgica Austriaca*, 2012, V tisku. ISSN 1682-8631. **IF 0,534** z r. 2010.

[2] **Varga**, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats. *Bratislava Medical Journal*, 2012, vol.113, no.1, p.5-9. ISSN 0006-9248. **IF 0,345** z r. 2010.

[3] Matia, I., **Varga**, M., Lodererová, A., Adamec, M. The positive effect of immunosuppression on adaptation of venous allografts to arterialisation in rats. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2010, vol. 39, no. 4, p. 478-484. ISSN 1078-5884. **IF 2,872**.

[4] Matia, I., Adamec, M., **Varga**, M., Janoušek, L., Lipár, K., Viklický, O. Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2008, vol. 35, no. 3, p. 353-357. ISSN 1078-5884. **IF 3,007**.

#### b) Bez impact factoru

[1] Matia, I., Adamec, M., Janoušek, L., Lipár, K., Marada, T., Klein, D., Baláž, P., **Varga**, M., Chlupáč, J., Rokošný, S. Klinické zkušenosti s použitím chladem konzervovaných žilních a tepenných alloštěpů: dlouhodobé výsledky. *Rozhledy v chirurgii*, 2010, roč. 89, č. 1, s. 45-54. ISSN 0035-9351.

### 10.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace

#### a) S impact factorem

[1] **Varga**, M., Sixta, B., Bem, R., Matia, I., Jirkovska, A., Adamec, M. Application of gentamicin- collagen sponge shortened wound healing after minor amputations in diabetic patients- a prospective, randomised trial. *Archives of Medical Science*, 2012, V tisku. ISSN 1734-1922. **IF 1,199** z r.2010.

[2] **Varga**, M., Matia, I., Kučera, M., Oliverius, M., Adamec, M. Polypropylene mesh repair of incisional hernia after kidney transplantation: single center experience and review of the literature. *Annals of Transplantation*, 2011, Vol 16, no. 3, p. 121-125. ISSN 1425-9524. **IF 0,975** z r. 2010.

[3] Oliverius, M., Kala, Z., **Varga**, M., Gürlich, R., Lánská, V., Kubešová, H. Radical surgery for pancreatic malignancy in the elderly. *Pancreatology*, 2010, vol. 10, no. 4, p. 499-502. ISSN 1424-3903. **IF 2,128**.

#### b) Bez impact factoru

- [1] Dubský, M., Jirkovská, A., Bém, R., Pagáčová, L., Fejfarová, V., **Varga**, M., Skibová, J., Langkramer, Š., Syková, E. Terapie kritické končetinové ischemie u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí autologních kmenových buněk. *Vnitřní lékařství*, 2011, roč. 57, č. 5, s. 451-455. ISSN 0042-773X.
- [2] **Varga**, M., Matia, I., Kučera, M., Sixta, B., Kočík, M., Oliverius, M., Pirk, J., Adamec, M. Akutní uzávěr splanchnického řečiště po kardiochirurgických výkonech. *Cor et Vasa*, 2010, roč. 52, č. 4, s. 252-256. ISSN 0010-8650.
- [3] Oliverius, M., **Varga**, M., Honsová, E. Chirurgická léčba gastrointestinálních stromálních nádorů. *Onkologie*, 2010, roč. 4, č. 1, s. 9-12. ISSN 1802-4475.
- [4] **Varga**, M., Valsamis, A., Matia, I., Peregrin, J., Honsová, E., Šafanda, M., Oliverius, M. Transarteriální chemoembolizace u hepatocelulárního karcinomu jater. *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 434-438. ISSN 0035-9351.
- [5] **Varga**, M., Oliverius, M., Valsamis, A., Kučera, M., Gürlich, R., Šafanda, M., Matia, I., Honsová, E. Resekce pankreatu pro metastázy karcinomu ledviny. *Klinická onkologie*, 2009, roč. 22, č. 6, s. 288-290. ISSN 0862-495X.
- [6] Gürlich, R., Oliverius, M., Lipár, K., **Varga**, M., Špičák, J., Štirand, P., Valsamis, A., Novotný, J., Vyhnánek, F. Výsledky jednorocního přežití u nemocných po resekci hlavy slinivky břišní s resekci žil portomezenterické oblasti (PMO). *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 417-421. ISSN 0035-9351.
- [7] Valsamis, A., Oliverius, M., **Varga**, M., Mareš, K. Primární retroperitoneální tumor - extraadrenální paragangliom - kazuistika. *Rozhledy v chirurgii*, 2008, roč. 87, č. 5, s. 263-267. ISSN 0035-9351.